Conclusions générales et perspectives

Le but principal de cette thèse était de caractériser de manière approfondie les états natifs et dénaturés d'une protéine globulaire afin de déterminer et d'essayer de comprendre certaines des lois régissant son repliement. Quelles sont les modifications structurales et dynamiques importantes qui peuvent influencer la stabilité de la conformation native et quels types d'interactions et d'états intermédiaires apparaissent lors du repliement ou du dépliement des protéines globulaires ont été les principales questions motivant ce travail de recherche.

Pour cela, il nous est apparu nécessaire de caractériser, tant d'un point de vue structural que dynamique, une protéine modèle dans diverses conditions dénaturantes. A cette fin, nous avons principalement utilisé les techniques de diffusion des neutrons et des rayons X et certains des résultats ont été interprétés à l'aide de la théorie des polymères. Ceci nous a permis d'apporter des informations nouvelles sur les états complètement dépliés.

Le choix de la protéine modèle s'est porté sur la néocarzinostatine dont la structure tertiaire particulière, commune à de nombreuses protéines, ne semble pas dépendre de la séquence. Actuellement, très peu d'informations sont disponibles sur le repliement de la NCS. Elle est, cependant, l'objet de très nombreuses études destinées à maîtriser ses propriétés anti-tumorales et à les diriger par remodelage moléculaire. Sa structure tridimensionnelle a été déterminée par cristallographie et résonance magnétique nucléaire, ainsi d'ailleurs que certains aspects de sa dynamique.

L'étude de l'état natif par diffusion des rayons X aux petits angles a permis d'obtenir des renseignements sur sa couche d'eau d'hydratation. Elle a une densité moyenne supérieure d'environ 4% à l'eau normale. La protéine native est très stable. Il faut, en effet, de fortes concentrations de chlorure de guanidinium ou de hautes températures pour la déplier. Ceci

peut être attribué à sa structure secondaire, qui est entièrement de type β, et à la présence de deux liaisons disulfure.

Malgré cela, nous avons pu caractériser les propriétés des états complètement dépliés obtenus par chauffage et addition de chlorure de guanidinium. Dans le premier cas, la solution de NCS se comporte comme une solution idéale alors que, dans le second cas, des interactions intermoléculaires répulsives sont présentes. Corrélativement, les conformations de la chaîne polypeptidique sont différentes dans les deux cas. En effet, le rayon de giration de la NCS dénaturée par la chaleur à 80°C est inférieur à celui de la protéine dénaturée par 5 M de chlorure de guanidinium. Cette constatation pourrait laisser supposer que la NCS n'est pas complètement dépliée dans le premier cas. Elle l'est en fait, mais elle est simplement moins « gonflée » parce que les interactions de volume exclu sont absentes. C'est ce que confirme la forme des spectres de diffusion qui montre que la protéine se comporte comme une chaîne idéale dans le premier cas et comme une chaîne à volume exclu dans le second. Avec les techniques classiques habituellement utilisées en biologie, il est impossible de mettre en évidence une telle différence de conformation. Pour les deux conformations les chaînes latérales sont complément exposées au solvant et peuvent adopter toutes les conformations accessibles autorisées par la rotation autour des liaisons covalentes, (les éléments de la chaîne n'entrent pas en contact les uns avec les autres si elle est en conformation de type volume exclu).

Pour décrire les spectres de diffusion, nous avons utilisé certaines données de la théorie des polymères et nous avons trouvé que la longueur curviligne de la chaîne polypeptidique est la même dans les deux cas. Elle est très légèrement inférieure à celle d'une chaîne en conformation β étendue, ce qui démontre que la NCS est très dépliée avec peu ou pas du tout d'éléments de structure résiduelles.

A l'aide d'une sonde moléculaire hydrophobe, il a été possible de mettre en évidence des états dénaturés intermédiaires apparaissant sous l'effet du chlorure de guanidinium. Ces états ont été observés à des concentrations de dénaturant comprises entre 1 et 3 M, que le tampon soit à base d'eau légère ou d'eau lourde. Ces intermédiaires sont très compacts et, en première approximation, possèdent des structures voisines de celle de la protéine native. Nous avons cherché à les caractériser thermodynamiquement à l'aide de la microcalorimétrie différentielle par balayage. Quelle que soit la concentration de dénaturant, un seul et unique

maximum de chaleur spécifique a été observé, à des températures d'autant plus basses que la concentration de chlorure de guanidinium est plus élevée. Nous en concluons que, dans ces conditions, la NCS présente une distribution continue d'états intermédiaires compacts dont le degré de dénaturation dépend de la concentration de dénaturant.

La description que nous donnons de ces états intermédiaires n'est malheureusement pas complète. La résonance magnétique nucléaire devrait permettre d'obtenir une caractérisation précise de la structure de ces états dénaturés compacts. D'autre part, de nombreuses questions restent en suspens. Par exemple, de tels états se forment-ils réellement lorsque la protéine se replie ? L'étude de la cinétique de repliement permettrait de répondre à cette question.

Une analyse de type SVD, faite sur les spectres de diffusion des rayons X, obtenus quand on dénature la protéine par chauffage, suggère qu'au minimum un état intermédiaire apparaît dans la zone de dépliement coopératif. Il possède une structure de type plutôt dépliée mais, comme dans le cas précédent, il n'est pas impossible qu'il s'agisse d'une distribution continue d'états plutôt que d'un état discret. Il serait nécessaire d'augmenter la précision des mesures et il n'est pas possible de confirmer un tel scénario.

Enfin, l'étude de la dynamique de la NCS, à l'échelle de la picoseconde, en fonction de la température, a permis d'apporter des informations expérimentales sur l'évolution des mouvements au sein d'une protéine en cours de dénaturation. Nous avons réalisé cette étude avec une solution concentrée de NCS afin de maintenir la protéine dans des conditions physiologiques et de pouvoir utiliser les résultats obtenus lors de l'étude structurale. Ceci nous a obligé de tenir compte de la diffusion des macromolécules dans le solvant et nous avons dû développer un modèle décrivant tous les mouvements qui peuvent apparaître lors de la dénaturation. Ce modèle ne s'applique pas au cas d'une protéine complètement dépliée. Il pourrait cependant être facilement généralisé en y intégrant les résultats théoriques déjà obtenus pour les chaînes polymériques.

La diffusion quasi-élastique incohérente des neutrons a révélé une modification importante des mouvements des atomes d'hydrogène de la NCS lors de la dénaturation. Pour la protéine native, les atomes d'hydrogène des chaînes latérales enfouies dans le cœur, formant la structure en feuillets β, sont tellement contraints que des mouvements à l'échelle de la dizaine de picosecondes, ne peuvent pas se produire. Les atomes d'hydrogène des

chaînes latérales exposées au solvant, comme celles des boucles et des structures aléatoires, donnent une contribution majoritaire à cette échelle de temps. Par contre, au cours de la dénaturation, les atomes d'hydrogène internes deviennent plus mobiles et leurs mouvements observables. A la température de demi-transition ils sont à peu près tous mobiles, bien que la protéine ne soit pas encore complètement dépliée. A cette température, les paramètres caractérisant la dynamique de la protéine ont une variation brusque.

Nous n'avons pas eu la possibilité d'étudier la dynamique de la NCS au-dessus de la température de demi-transition. Il serait évidemment très instructif de prolonger cette étude aux conformations complètement dépliées. Il est cependant possible de prévoir comment certains paramètres pourraient se comporter. Par exemple, le nombre des atomes d'hydrogène immobiles s'annulera et la taille moyenne de leur région de confinement augmentera. Il restera à déterminer comment l'exposition totale des chaînes latérales au solvant et la température influencent la moyenne quadratique des déplacements atomiques et à détecter les mouvements des éléments statistiques de la chaîne complètement dépliée.

Ces résultats ouvrent beaucoup de perspectives quant à l'étude de la dynamique des protéines en solution. Il serait intéressant de répéter ces expériences avec des résolutions instrumentales variables afin d'obtenir une description plus complète des mouvements de la protéine. Une comparaison avec les résultats des expériences de RMN à différentes températures serait alors possible. Finalement, il serait aussi très instructif de comparer les résultats expérimentaux à ceux que pourraient donner des simulations par dynamique moléculaire.

En raison de ses propriétés structurales particulières, la NCS se révèle être un très bon modèle pour étudier le repliement, ou le dépliement, des protéines globulaires. Dans ce contexte, l'influence des liaisons disulfure pourrait être aussi étudiée. Comme nous disposions d'un mutant de la NCS, dans lequel la liaison disulfure entre les acides aminés 37 et 47 a été éliminée par mutagenèse, nous avons pu réaliser quelques expériences préliminaires en fonction de la température. La diffusion des rayons X aux petits angles a montré que la stabilité de ce mutant est bien plus faible que celle de la protéine sauvage. La courbe de transition présentée dans la figure 1, montre une réduction d'environ douze degrés de la température de demi-transition. Les spectres de diffusion prouvent que ce mutant est totalement déplié au-dessus de 60°C. Les variations de dichroïsme circulaire et de

fluorescence démontrent qu'il perd sa structure secondaire entre 40 et 55°C et sa conformation tertiaire entre 50 et 65°C (fig. 2). Il est donc clair que la liaison disulfure entre les acides aminés 37 et 47 stabilise très fortement la NCS sauvage vis-à-vis des changements de température. Par contre, il est apparu impossible d'étudier l'effet de la deuxième liaison disulfure parce que la protéine dépourvue de cette dernière est incapable de se replier lors de son expression dans *E. coli*. Ce dernier résultat démontre directement que la présence d'une liaison disulfure peut être cruciale pour le repliement parce qu'elle détermine le début de la séquence des conformations qui conduisent la protéine à sa forme native. Ces résultats ouvrent donc d'intéressantes perspectives dans l'étude de l'influence des liaisons disulfures sur le repliement des protéines.

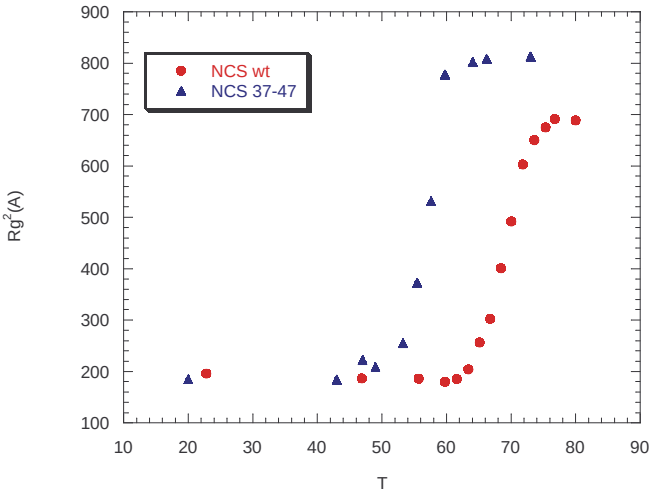
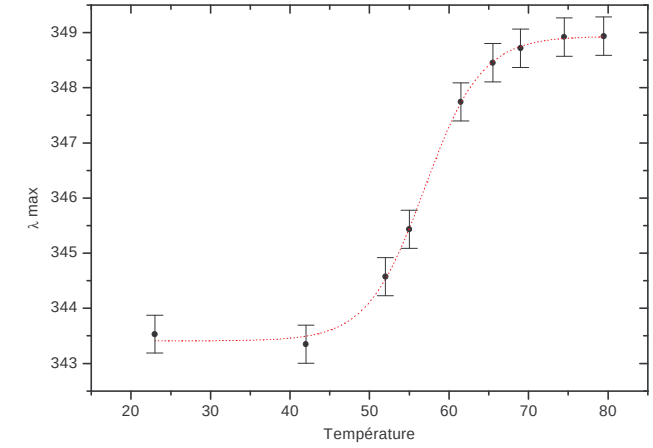
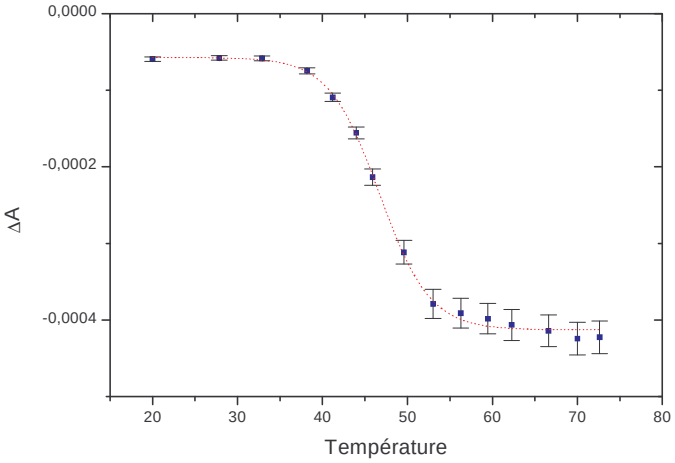


Fig 1. *Transition de dénaturation en température, suivie par la variation du carré du rayon de giration pour la protéine sauvage et pour le mutant 37-47.*



A



B

Fig 2. A) *transition de dénaturation du mutant NCS 37-47 établie en fluorescence et* **B)** *par variation de l'ellipticité.*

Nous avons aussi tenté quelques expériences préliminaires afin de déterminer l'effet de la pression sur la NCS. De nombreuses études de protéines ont déjà intégré la pression comme variable, mais elles restent limitées à de relativement faibles changements de structure, vraisemblablement induits pas les variations des propriétés physico-chimiques du solvant. Par contre, très peu de travaux concernent directement la dénaturation et le dépliement des protéines sous l'effet de la pression. Nous avons déjà réalisé quelques mesures préliminaires de fluorescence statique en fonction de la pression, jusqu'à 2 kbar (Fig 3). Seules de petites variations du signal ont été observées, que ce soit avec la protéine sauvage ou le mutant. Nous disposions d'une cellule permettant d'atteindre une pression d'environ 1 kbar et d'effectuer des expériences de diffusion de neutrons à des transferts de moment

inférieurs à 0,35 $Å^{-1}$ [M. Bonetti et al., Rev. Sci. Instr. 70 (1999) 4015-4019]. Lors d'un premier et unique essai, nous n'avons pas réussi à observer le début de la déstructuration de la NCS. Une nouvelle cellule permettant d'atteindre des pressions supérieures est en cours d'essai. Elle devrait remédier aux difficultés rencontrées précédemment et permettre de continuer cette étude.

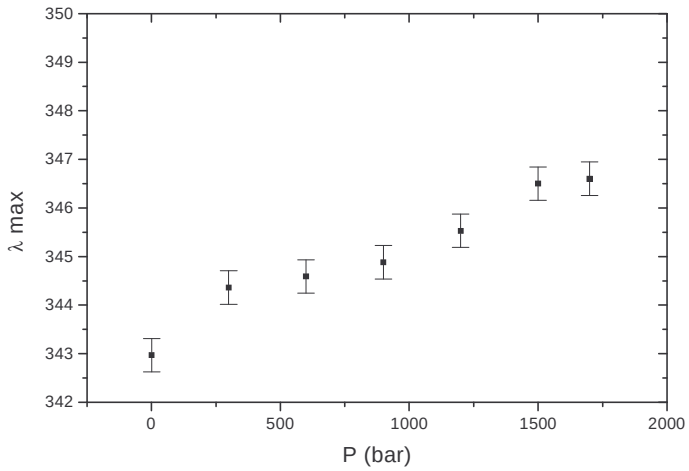


Fig 3. *Variation le la longueur d'émission maximale, à la température de 53.°C, en fonction de la pression pour la NCS sauvage.*